

УДК 616.379—00.64—06:616.13—002

А. С. Ефимов, В. М. Гордиенко, Ю. В. Ткачук,
И. М. Мельник, Л. А. Каминский

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИАБЕТИЧЕСКИХ АНГИОПАТИЙ

Несмотря на большое количество исследований, ряд важных вопросов патогенеза диабетических ангиопатий окончательно не выяснен [2, 3, 9]. Создание новых лекарственных средств, методов ранней диагностики, успешного лечения и профилактики диабетических ангиопатий требует предварительной апробации их на адекватных экспериментальных моделях.

Есть данные об отдельных биохимических и морфологических нарушениях при экспериментальном диабете у животных [1, 4—7]. В литературе, однако, не описаны микроциркуляторные нарушения при экспериментальном диабете, в корреляции с метаболическими сдвигами и структурными изменениями.

Мы изучали на экспериментальной модели длительно текущего аллоксанового диабета у крыс состояние сосудов микроциркуляторного русла и морфологические изменения в сосудах мышц конечностей, а также состояние некоторых внутренних органов (почки, печень, миокард).

Методика исследований

Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 140—160 г. Диабет воспроизводили однократным подкожным введением 150 мг/кг 5 % водного раствора аллоксана фирмы «Хемапол». Опытную группу составили 18 животных, содержание глюкозы у которых после введения аллоксана превышало 300 мг%, имелась выраженная глюкозурия, полидипсия и полиурия. Контроль — 10 интактных крыс.

В течение всего эксперимента у животных определяли в крови содержание глюкозы — орто-толуидиновым методом, фруктозы — по Рою, холестерина — по Ильку. Состояние сосудов микроциркуляторного русла у аллоксандиабетических крыс исследовали через 6—12 мес после возникновения диабета с помощью витальной биомикроскопии радужной оболочки. Биомикроскопию осуществляли под микроскопом МБС-2 с фотоприставкой и лампой-вспышкой. Для гистологического исследования кусочки почки, печени, миокарда фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезживали в спирте, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Электронномикроскопическое исследование капилляров мышц конечностей в опытной и контрольной группах выполнено на электронном микроскопе JEM-100С при ускоряющем напряжении 80 кВ. Кусочки мышечной ткани фиксировали 2 % осмиевым фиксатором по Миллонику [8], обезживали и заключали в эпон 812. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу [10]. Срезы капилляров фотографировали при увеличении 5—8 тыс. раз, негативы увеличивали в 5 раз.

Результаты исследований и их обсуждение

Биохимическими исследованиями здоровых животных перед введением аллоксана установлено, что глюкоза крови составляет $108,6 \pm 4,1$ мг %, фруктоза — $3,31 \pm 0,47$ мг %, холестерин — $112 \pm 4,6$ мг %.

Кровеносная сеть радужки здоровых животных не выражена, магистральные сосуды ближе к зрачковой области радужки уменьшаются в калибре, прямолинейны с наличием небольшого количества мелких сосудов между ними. Артериолы и вены минимально извиты, идут почти параллельно (рис. 1 а).

Введение аллоксана привело к выраженным изменениям изучаемых показателей. У подопытных животных отмечалась гипергликемия — $346,7 \pm 30,6$ мг % ($p < 0,001$), содержание фруктозы повысилось до $12,3 \pm 2,57$ мг % ($p < 0,01$), холестерина — недостоверно ($p > 0,1$) — до $122 \pm 5,6$ мг %.

При продолжительном течении декомпенсированного аллоксанового диабета у животных появились характерные изменения микрососудов. Сосудистый рисунок радужки резко подчеркнут. Вены петлевид-



Рис. 1. Микрофотография сосудов радужной оболочки крыс:

а — у интактных животных сосуды слабо выражены, прямолинейны, идут почти параллельно. Ув. 32х. *б* — у аллоксандиабетических животных сосудистый рисунок резко подчеркнут, вены, петлевидно извиты, резко расширены. Видны единичные микроаневризмы и кровоизлияния. Ув. 32х.

но извиты, резко расширены. Все сосуды инъецированы, с ампуловидными выпячиваниями. Вблизи зрачковой зоны радужки видны единичные микроаневризмы, кровоизлияния. Кровоток замедлен, встречаются участки стаза и тромбоза. У 75 % животных развилась зрелая катаракта, как правило, обоих глаз (рис. 1 б).

При гистологическом исследовании внутренних органов крыс с выраженными признаками аллоксанового диабета обнаружены следующие структурные изменения. Почки макроскопически не изменены. Микроскопически определяется уменьшение размеров клубочков, капилляры их сужены, иногда спавшиеся, либо с варикозными расширениями. Ядра эндотелия гиперхромны. Иногда между петлями капилляров встречаются капли гиалина. Щель капсулы клубочков значительно расширена, а стенки капсулы утолщены. Вокруг клубочков часто определяются лимфоцитарные инфильтраты. Эпителий извитых канальцев местами набухший, вследствие чего просветы в таких канальцах сужены, местами, наоборот, эпителий утолщен, ядра резко гиперхромные и просветы канальцев расширены. Встречаются участки деструкции канальцев, эпителиальные клетки часто десквамированы, ядра пикнотичные, либо отсутствуют, а вокруг таких канальцев скопления лимфоцитов, гистиоцитов и фибробластов. В просветах канальцев обнаруживаются гиалиновые цилиндры. В прямых канальцах измене-

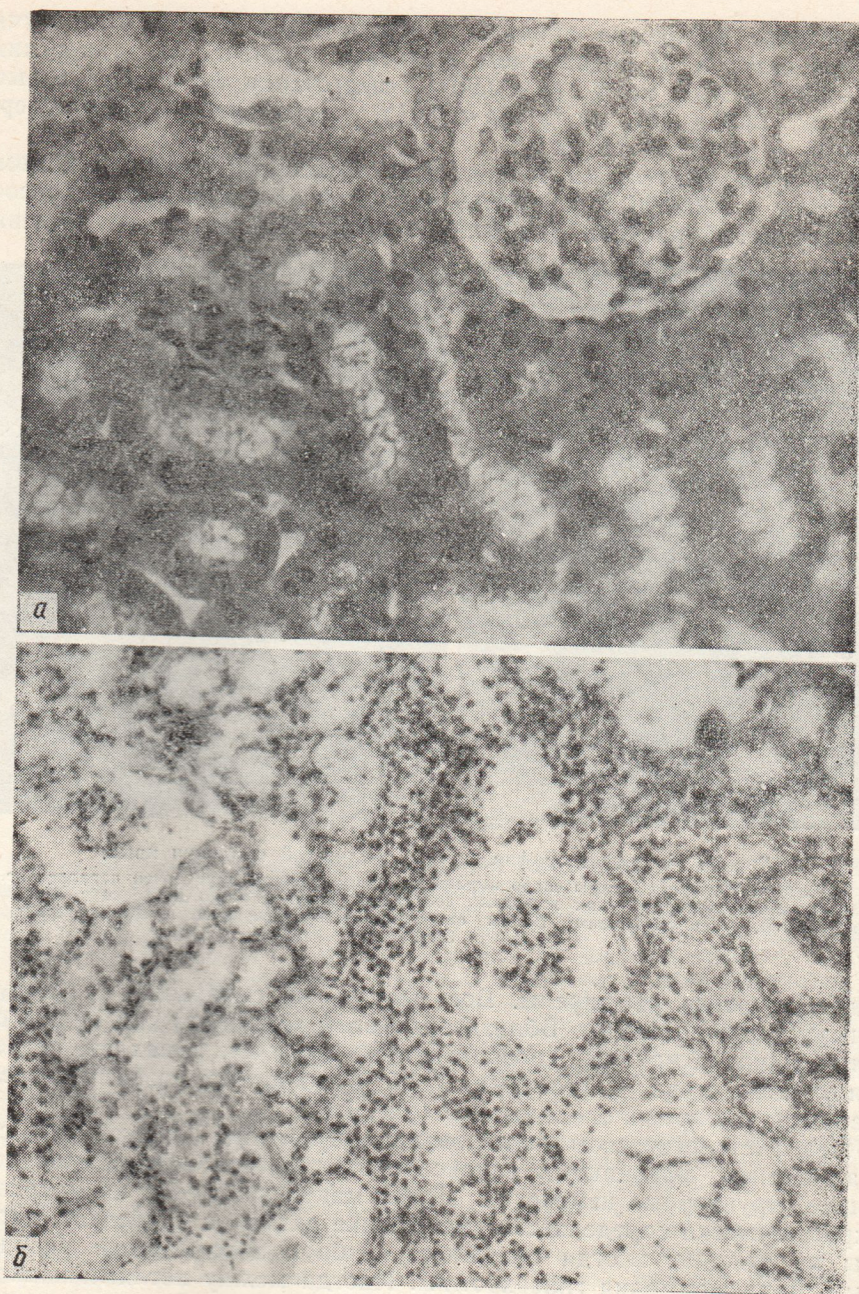


Рис. 2. Микрофотография почек крыс:

а — почка интактной крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200×. *б* — почка аллоксандиабетической крысы. Клубочки сморщены, резко расширена щель капсулы, лимфоцитарные инфильтраты, стенки кровеносных сосудов утолщены. Ув. 100×.

ния выражены менее отчетливо, однако в них определяется утолщение эпителиальных клеток и гиперхромность ядер, а между канальцами нередко встречаются лимфоцитарные инфильтраты. Обращает на себя внимание утолщение стенок кровеносных сосудов, плазматическое пропитывание их и разрастание адвентициального слоя (рис. 2 *а, б*).

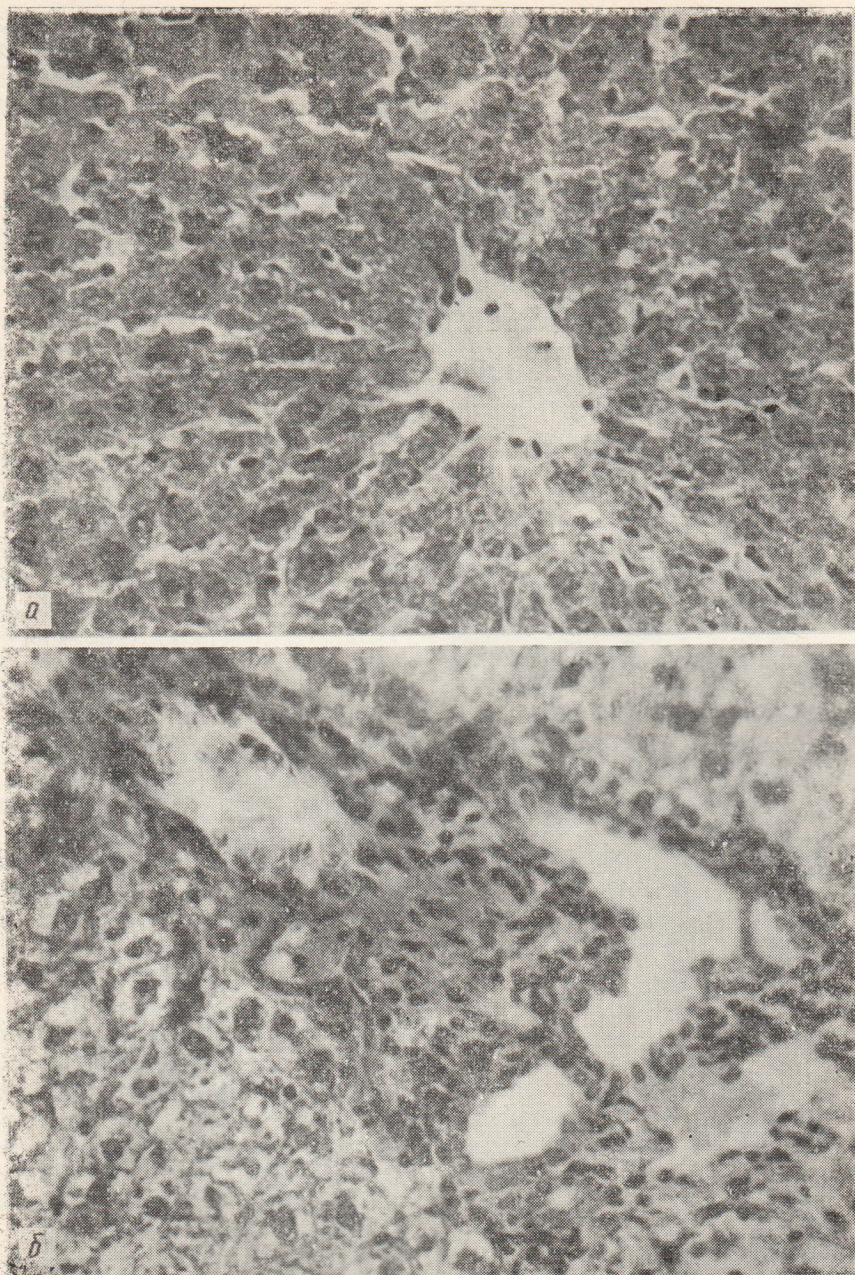


Рис. 3. Микрофотография печени крыс:

а — печень intactной крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200 $\times$. *б* — печень аллоксандиабетической крысы. Резко выраженное разрастание соединительной ткани вокруг кровеносных сосудов и желчных протоков. Гепатоциты набухшие, протоплазма вакуолизирована, ядра пикнотичные. Ув. 200 $\times$.

В печени гепатоциты набухшие, межаббекулярные пространства не определяются, балочная структура долей нарушена. Большинство гепатоцитов имеет крупнозернистую протоплазму, причем нередко зерна скапливаются в виде крупных глыбок у одного из полюсов клетки. Ядра гиперхромные, иногда отсутствуют. Встречаются группы клеток

в состоянии некроза. Нередко гепатоциты резко увеличены в размерах, протоплазма состоит из крупных вакуолей, а гиперхромное ядро оттеснено к периферии. Много также темных клеток. Они уменьшены в размерах, угловатой формы, протоплазма резко оксифильная, гомогенная, а ядра гиперхромные.

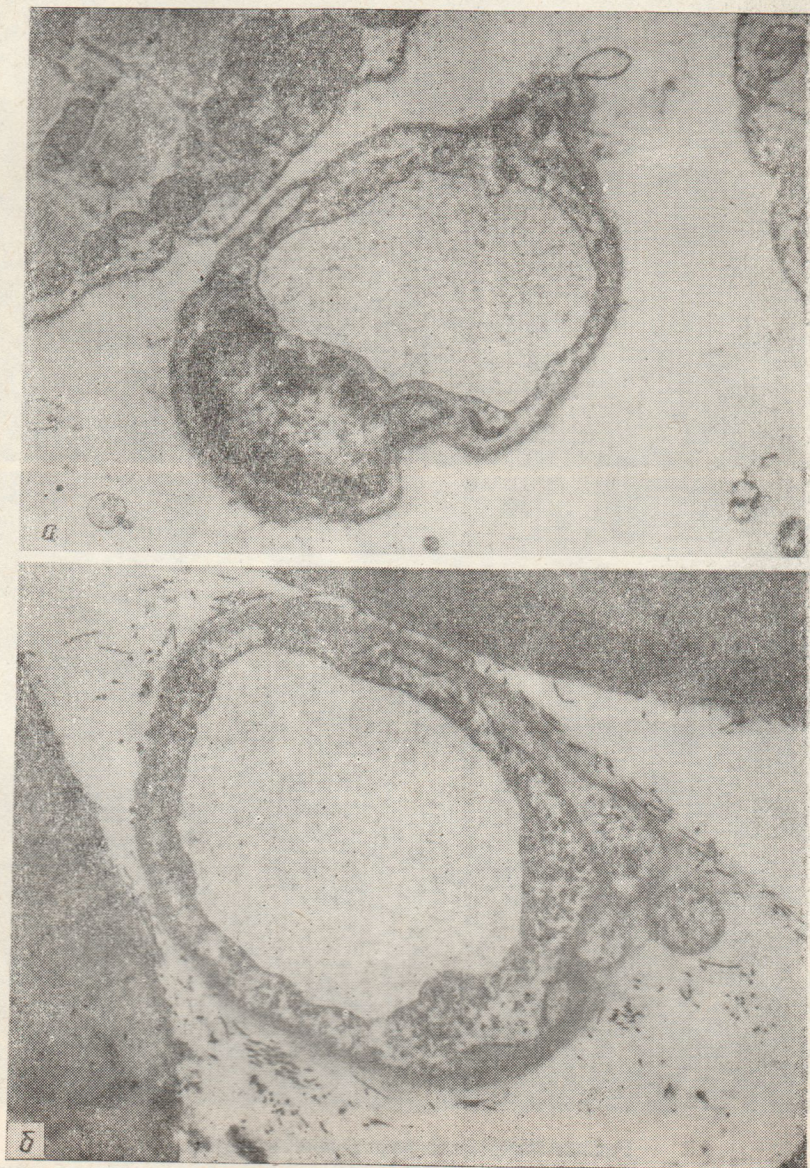


Рис. 4. Электронная микрофотография мышечного капилляра крысы:
 а — капилляр intactной крысы. Ув. 10 000×. б — капилляр аллоксандиабетической
 Значительное (до 150 нм) утолщение базального слоя. Ув. 10 000×.

Центральные вены расширены, сосуды триад с утолщенной стенкой и периваскулярными инфильтратами. Иногда встречаются триады, вокруг которых увеличено количество соединительнотканых волокон, а между ними определяются фиброциты, гистиоциты, лимфоциты и еди-

нические плазматические клетки. Ядра купферовских клеток чаще набухшие, увеличены в размерах, но встречаются и сморщенные клетки с пикнотичными ядрами.

Глиссонова капсула несколько утолщена, количество фиброцитов в ней увеличено (рис. 3 а, б).

В миокарде волокна с нечеткой поперечной исчерченностью, саркоплазма гомогенная, а местами мелкозернистая. Ядра волокон гиперхромные, кровеносные сосуды умеренно полнокровные, ядра эндотелия сосудов набухшие.

Таким образом, длительное течение аллоксанового диабета приводит к развитию глубоких дистрофических и деструктивных изменений в почках и печени, менее выражено изменяется структура миокарда. В почках ведущими признаками повреждения являются гломерулосклероз, а также явления нефрозо-нефрита. В печени выраженная паренхиматозная дистрофия с очагами некроза и периваскулярных воспалительных изменений. В миокарде умеренно выраженная паренхиматозная дистрофия.

При электронномикроскопическом исследовании в капиллярах скелетных мышц выявлена гиперплазия эндотелия, выраженный пиноцитоз, разрыхление и утолщение базального слоя, а также появление вокруг сосудов значительного количества осмиофильных коллагеновых волокон, то есть в мышцах конечностей крыс с аллоксановым диабетом уже через 6 мес развиваются признаки диабетической микроангиопатии (рис. 4 а, б).

Одним из наиболее ранних и постоянных признаков микроангиопатии является утолщение базального слоя капилляров, что позволяет не только определить поражение, но и осуществить количественную оценку степени его выраженности, а следовательно и тяжести.

Измерения средней толщины базальной мембраны капилляров у контрольных и подопытных животных показали, что уже через 6 мес эксперимента у крыс с аллоксановым диабетом она увеличивается примерно в полтора раза (до 90 нм, в контрольной группе — 55—60 нм), через 9 мес — в два раза (120 нм), а через 12 мес — в три — четыре раза (160—220 нм).

Таким образом, проведенные исследования показали, что при длительно текущем аллоксановом диабете у крыс на фоне выраженных дистрофических и деструктивных изменений в почках и печени обнаруживаются признаки поражения микроциркуляторного русла, напоминающие наблюдаемые у людей, страдающих сахарным диабетом. Поражения сосудов регистрируются при электронномикроскопическом исследовании мышц конечностей, а также при биомикроскопии радужной оболочки.

Полученная модель диабетических ангиопатий может быть использована для изучения методов лечения метаболических нарушений, возникающих при сахарном диабете.

A. S. Efimov, V. M. Gordienko, Yu. V. Tkachuk,
I. M. Melnik, L. A. Kaminsky

EXPERIMENTAL MODELLING OF DIABETIC ANGIOPATHIES

Summary

It is shown that lingering alloxan diabetes in rats causes affection of microcirculatory bed vessels and of certain viscera which are similar to those observed in patients with diabetes mellitus. Glomerulosclerosis and nephrosis-nephritic phenomena

were major signs of affection in the kidneys; an expressed parenchymatous degeneration with necrosis foci and perivascular inflammatory changes—in the liver; a moderate expressed parenchymatous degeneration—in the myocardium. Electron microscopy determined that the muscle capillary basal membrane thickens 1.5, 2, 3-4 times when diabetes lasts for 6, 9 and 12 months, respectively. Vital biomicroscopy of the eye iris revealed microcirculation disturbances with stasis and thrombosis foci and microaneurisms. The obtained model of diabetic angiopathies may be used for studying methods of treating, prophylaxis and diagnosis of the given pathology.

Institute of Endocrinology and Metabolism, Kiev

Список литературы

1. Баранов В. Г., Соколоверова И. М., Чембарцева А. Н. Изменение капилляров клубочков почки при аллоксановом диабете у крыс.—Пробл. эндокринологии, 1972, 18, № 4, с. 50—56.
2. Ефимов А. С. Диабетические ангиопатии. Киев: Здоров'я, 1973. 148 с.
3. Зефирова Г. С. Диабетическая микроангиопатия.—Терапевт. арх., 1977, № 5, с. 11—16.
4. Наследова И. Д., Соколоверова И. М., Дзерзанова Н. Я., Онегова Р. Ф. Некоторые изменения липидного обмена и состояние сосудистой стенки при длительно текущем аллоксановом диабете у крыс.—Пробл. эндокринологии, 1974, 20, № 4, с. 59—63.
5. Наследова И. Д., Соколоверова И. М., Онегова Р. Ф. Патологические изменения в почках у потомства крыс-самок с аллоксановым диабетом.—Пробл. эндокринологии, 1979, 25, № 6, с. 54—55.
6. Пушкарев Ю. П. Механизм нарушения нервно-мышечной передачи у крыс с аллоксановым диабетом.—Пробл. эндокринологии, 1978, 24, № 2, с. 77—79.
7. Bloodworth J. M., Engerman R. L. Diabetic microangiopathy in the experimentally diabetic dog and its prevention by careful control with insulin.—Diabetes, 1973, 22, p. 290.
8. Millonig G. Advantages of a phosphate buffer of OsO_4 solutions in fixation.—J. Appl. Phys., 1961, 32, p. 1637—1640.
9. Spiro R. G. Search for biochemical basis of diabetic microangiopathy.—Diabetologia, 1976, 12, N 1, p. 1—14.
10. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.—J. Cell. Biol., 1963, 17, p. 208—212.

Диабетологический отдел
и лаборатория патоморфологии
Киевского института эндокринологии и обмена веществ

Поступила в редакцию
3.IV 1980 г.